

# VU Research Portal

## Bone Regeneration during Vertical Distraction Osteogenesis in the Human Mandible

Amir, L.R.

2007

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Amir, L. R. (2007). *Bone Regeneration during Vertical Distraction Osteogenesis in the Human Mandible*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## *Chapter 7*

### **Samenvatting en Algemene Discussie**

## **Algemene discussie**

Distractie osteogenese (DO) werd oorspronkelijk ontwikkeld door orthopedische chirurgen om pijpbeenderen van de extremiteiten te verlengen. Later werd DO ook toegepast bij de maxillofaciale chirurgie om in het craniofaciale gebied bot te regenereren. In principe betreft DO een osteotomie waardoor een fractuur wordt veroorzaakt; in de fractuur spleet wordt callusweefsel gevormd. Op dit callusweefsel wordt vervolgens een trekkracht uitgeoefend door beide botstukken geleidelijk met behulp van een distractor uiteen te trekken. De trekkracht induceert de vorming van botweefsel in het fractuurgebied en tegelijk de aanleg van spieren, zenuwen en bindweefsel. Deze techniek, waarbij gebruik wordt gemaakt van mechanische belasting, is een geschikte en snelle manier om botmassa te verkrijgen en biedt een aantrekkelijk alternatief voor andere botregeneratie methoden zoals transplantatie van autoloog bot (bot van de patiënt zelf), allogeen bot (bot van andere patiënten) of van synthetisch bot.

Studies met proefdieren hebben veel gegevens opgeleverd waardoor de toepassing van DO in de kliniek geoptimaliseerd kon worden. Deze studies gaven tevens inzicht in de cellulaire en moleculaire veranderingen tijdens de DO-geïnduceerde botvorming. Tot dusverre zijn er zeer weinig studies gedaan bij patiënten naar cellulaire en moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan DO-geïnduceerde botheling. Dergelijke studies naar effecten van DO op botheling zijn meestal retrospectief van aard. Daarbij komt ook dat het klinische verloop van botgenezing meestal onderzocht is met behulp van non-invasieve technieken zoals bv radiografie. Het feit dat in het door DO gevormde kaakbot gaten geboord moeten worden om tandimplantaten te kunnen plaatsen gaf in het huidige onderzoek de gelegenheid botbiopten voor histologisch onderzoek te verkrijgen, zonder daarbij de patiënt extra te belasten. In dit proefschrift is dit onderzoeksmodel gebruikt. Het verkrijgen van biopten maakte het mogelijk om in de tandeloze onderkaak van oudere patiënten het verloop van botherstel na distractie prospectief en gedetailleerd te onderzoeken (*hoofdstukken 2-4*). In hoofdstuk 5 is gebruik gemaakt van een ander

experimenteel model. Om een synthetisch peptide (TP508) te testen dat botvorming tijdens DO zou stimuleren werden pijpbeenderen uit de poten van konijnen gebruikt.

In *hoofdstuk 1* is op basis van literatuurgegevens een overzicht gegeven van de verschillende aspecten die een rol spelen bij DO. Verder zijn in dat hoofdstuk de leemten in kennis besproken over DO om de klinische toepassing in de craniofaciale chirurgie te kunnen verbeteren.

*Hoofdstuk 2* is een prospectieve studie die uitgevoerd is op biopten van 16 oudere patiënten die DO van de onderkaak ondergingen om voldoende bot te verkrijgen voor het plaatsen van implantaten. Het doel was na te gaan welke van twee veel gebruikte distractie snelheden het meeste bot oplevert bij gelijkblijvende hersteltijd. Een andere doelstelling was na te gaan hoeveel tijd na het stoppen van distractie nodig was om de distractiespleet met bot te overbruggen, met de distractor nog in gefixeerde positie om te veel beweging van het weefsel in de spleet te vermijden. Botstukken werden over een lengte van 10 mm uiteen getrokken met een snelheid van 0.5 of 1.0 mm/dag; daarna werd de spleet met distractor in neutrale positie 7-20 weken ongemoeid gelaten. Een probleem bleek dat tijdens het nemen van het biopt bij bijna de helft van de gevallen het biopt afbrak en deels achterbleef in de distractiespleet. Andere biopten die er wel heel uitkwamen bleken korter dan verwacht mocht worden op grond van de verlenging van de distractor. De biopten werden onontkalkt verwerkt voor histologie en histomorfometrisch geanalyseerd. Om de sluiting van de spleet onafhankelijk van histologie te bevestigen werd ook – vóór histologische verwerking - een klein aantal intacte biopten gescand met behulp van microgecomputerizeerde tomografie ( $\mu$ CT).

Histologisch onderzoek liet zien dat sommige biopten ineengedrukt waren of dat het zachte bindweefsel in de spleet niet recht maar enigszins schuin in de spleet verliep zodat een volledige spleetbreedte van 10 mm niet werd bereikt. De biopten bevatten oud, intact bot met een deel van het bindweefsel uit de distractiespleet waarin jonge bottrabekels groeiden.

Histomorfometrie van de botbiopten toonde aan dat er meer bot gevormd was in de groep patiënten behandeld met een distractiesnelheid van 0.5 mm/dag dan 1.0 mm/dag. Deze groep had langere bottrabekels gevormd met een iets verhoogd botvolume. Bovendien leek de overbrugging van de spleet door nieuw bot eerder plaats te vinden in de 0.5 mm/dag groep, hoewel het aantal intacte biopten maar erg klein was.

Deze studie toonde aan dat ondanks de relatief hoge leeftijd van de patiënten en de ernst van de kaakatrofie, distractie van de botstukken toch in staat bleek de cellen te activeren om bot te vormen. Van de twee onderzochte distractie snelheden gaf een lagere distractie snelheid een iets beter resultaat te zien dan een hogere snelheid; een vergelijkbaar effect was ook gevonden bij DO in pijpbeenderen bij konijnen, varkens and schapen, hoewel in die studies de optimale snelheid hoger lag. De tijd nodig om de spleet met bot te overbruggen verschilde met die van dierstudies: in patiënten duurde dat veel langer dan in proefdieren. Deze verschillen zijn wellicht toe te schrijven aan verschillen in botmetabolisme (laag bij de mens), leeftijd (hoog bij de huidige patiënten groep), weefseldoorbloeding (wisselend bij ouderen) en vitaliteit van het botweefsel (in onze patiëntengroep: atrofisch met in sommige gebieden lege osteocytlacunen).

Mechanische belasting stimuleerde niet alleen fractuurherstel en vorming van nieuw bot in het bindweefsel van de spleet, maar had ook effect op de structuur van het bestaande bot. Belasting door distractie stimuleerde de osteoidvorming in het bestaande botsegment met een factor 4 ten opzichte van ‘onbelast’ bot vóór distractie. Dus, een langzame distractie induceert vorming van nieuw bot in de fractuurspleet en verhoogt de botvorming in het oude bot om de draagkracht van het botweefsel te vergroten. Deze bevindingen komen overeen met de wet van Wolff die stelt dat bot in staat is zijn structuur aan te passen aan de mechanische eisen die aan het weefsel gesteld worden.

Kort samengevat, de waarnemingen in hoofdstuk 2 wezen er op dat de behandelingsprotocollen die zijn opgesteld bij proefdieren niet eenvoudigweg

geëxtrapoleerd mogen worden naar de kliniek maar met enige reserve bekeken moeten worden.

Bloedvatvorming gaat vooraf aan botvorming en bij een paar patiënten bij wie na DO weinig bot gevormd was, viel op dat ook de vascularisatie gebrekkig was. Uit dierstudies was bekend dat voor botvorming bloedvatvorming van groot belang is. In *hoofdstuk 3* testten we de hypothese dat botvorming in de distractiespleet gerelateerd was aan bloedvatvorming. Dit gingen we na voor beide groepen uit het vorige hoofdstuk door histomorfometrisch het volume van de bloedvaten te meten in dezelfde bipten waarin ook het bot volume was gemeten. Twee groepen van elk drie patiënten werden geselecteerd met gemiddeld dezelfde leeftijd, en van wie de bipten van voldoende kwaliteit waren om de vaten goed te kunnen herkennen. De groep die met 0.5 mm/dag gedistraheerd was, had een hoger bloedvatvolume per eenheid weefseloppervlak dan de andere groep. Dit gold alleen voor het regeneratiegebied met jonge, snel-groeiende bottrabekels dicht bij het centrum van de distractiespleet, niet voor het gebied dichtbij de osteotomie lijn waar de trabekels ouder waren. Deze toename in bloedvatvolume kwam overeen met een toename in het *aantal* bloedvaten. In het gebied waar het bot jong en net gevormd was, bleek het bloedvatvolume rechtstreeks gerelateerd aan het botvolume. Deze correlatie suggereerde inderdaad dat vascularisatie nodig is voor vorming van nieuw bot. Dat een betere vascularisatie bereikt wordt bij een lagere distractiesnelheid (0.5 mm/dag) zou op verschillende manieren verklaard kunnen worden: (1) bij deze oudere patiënten worden bij een hogere distractiesnelheid de capillairen die in het bindweefsel van de spleet aan het vormen zijn sneller beschadigd dan bij een lagere snelheid; (2) een lagere snelheid van distractie stimuleert angiogenesis in het zachte bindweefsel van de spleet mechanisch mogelijk meer dan een hogere snelheid.

De resultaten van *hoofdstuk 3* lieten zien dat bij oudere patiënten een lagere distractiesnelheid beter is voor bloedvatvorming in de fractuurspleet en dus ook voor botvorming die immers sterk afhangt van een goede bloedtoevoer. Het klinische belang van deze studies is dat bij oudere patiënten

de genezingstijd nodig om de spleet met bot te overbruggen mogelijk verkort kan worden door de gebruikelijke distractiesnelheid van 1.0 mm/dag te verlagen naar 0.5 mm/dag.

Op grond van dierstudies werd aangenomen dat ook bij patiënten de cellulaire en moleculaire mechanismen van botvorming onder invloed van distractie identiek zijn aan de processen die optreden bij normaal fractuurherstel zonder distractie. In humaan kaakbot was dit niet aangetoond, mogelijk vanwege de moeilijkheid om weefselbiopten uit het geregenereerde gebied te verkrijgen. In *hoofdstuk 4* onderzochten wij de eiwitsynthese activiteit in botcellen in het regenererend kaakbot model met behulp van immunohistochemie. We gebruikten antilichamen tegen RUNX2, een heel vroege marker voor cellen met osteogene potentie. RUNX2 is een transcriptiefactor, een essentieel regulatie eiwit dat in de kern van osteogene cellen de transcriptie aanzet van de belangrijkste boteiwitten die de organische matrix vormen van bot. Zonder RUNX2 eiwit kan er geen bot gevormd worden en dit wordt voorafgaand van botvorming al aangemaakt. De aanwezigheid van RUNX2 eiwit in ongedifferentieerde bindweefselcellen suggereert dat deze cellen de potentie hebben om osteoblast te worden. Indien de fibroblast-achtige cellen in het bindweefsel van de distractiespleet geen RUNX2 (kunnen) maken, stammen zij mogelijk af van een ander cellijn zonder osteoblastpotentie die mogelijk betrokken is bij de vorming van een fibreus weefsel dat de aaneengroei van de botstukken voorkomt (non-union). We gebruikten ook antilichamen tegen late markers van (pre)osteoblasten en osteocyten: osteopontine (OPN), bone sialoproteïne (BSP), dentin matrix proteïne-1 (DMP1) and matrix extracellulair phosphoglycoproteïne (MEPE).

De verdeling van deze eiwitten in het gedistraheerde humane kaakweefsel kwam overeen met wat ook in proefdierstudies werd gevonden voor normaal fractuurherstel en voor botherstel na distractie. Veel fibroblast-achtige cellen in het bindweefsel van de spleet waren positief voor RUNX2 hetgeen deze cellen kenmerkt als osteoblast-achtig. Zodra deze cellen differentieerden tot osteoblasten en osteocyten, kleurden ze ook aan voor OPN en BSP. DMP1

en MEPE kleuring was vrijwel uitsluitend te zien in osteocyten. Vergelijking tussen bipten vóór en na distractie liet zien dat na distractie meer cellen aankleurden voor RUNX2 en matrix eiwitten dan vóór distractie. Ook was de intensiteit van aankleuring hoger in gedistraheerd weefsel dan in niet-gedistraheerd weefsel. Dit werd waargenomen in bot trabekels gevormd in de spleet en in het oude bot dat al aanwezig was vóór distractie. Deze resultaten ondersteunden met de bevindingen in *hoofdstuk 2* en bevestigden dat na distractie inderdaad meer cellen actief waren en meer osteoid produceerden.

De verdeling van de osteocytmarkers DMP1 en MEPE in predistractiebot was ook anders dan na distractie. Beide eiwittypen waren te zien in enkele volwassen (platte) osteocyten gelegen in lamellair bot gevormd na distractie, iets wat niet het geval was vóór distractie. In de literatuur is vermeld dat mechanische belasting van muizenbot de transcriptie van het DMP1-gen in osteocyten kon stimuleren via een belastingsgevoelig-regulatie element gelegen in de promoter van het DMP1-gen. Osteocyten zijn de botcellen die gevoelig zijn voor mechanische belasting en reageren daarop door oplosbare signalen (zoals NO en prostaglandines) af te geven naar de effectorcellen (osteoblasten, botrandcellen en osteoclasten) aan het botoppervlak. Gebaseerd op dit concept brachten wij de hypothese naar voren dat de toename in DMP1 kleuring in osteocyten na distractie (en mogelijk ook MEPE) een directe reactie van deze cellen is op de distractie van het bot.

In de literatuur zijn verschillende nadelen en complicaties gemeld die kunnen optreden tijdens DO. Een langdurige neutrofixatie waarbij de distractor op zijn plaats gehouden moet worden om de fractuur te laten dichtgroeien leidt vaak tot infectie. Stabilisatie van de fractuur is essentieel voor de vorming van voldoende nieuw bot. De genezingstijd in de kaak duurt relatief lang, tenminste 10-12 weken na een verlenging van ongeveer 10 mm. Soms moet deze periode nog verlengd worden indien botvorming langzaam verloopt zoals bij oudere patiënten of bij patiënten met een slechte vascularisatie. Een manier om het botvormingsproces in de spleet te



bespoedigen zou daarom gunstig zijn voor de patiënt. Effecten van lokale injecties met botgroei-stimulerende stoffen zoals bone morphogenetic proteins (BMPs) of transforming growth factor  $\beta$ 's (TGF $\beta$ s), het gebruik van ultrageluid of het stimuleren van bloedvatgroei door groeifactoren zoals vascular endothelial growth factor (VEGF) zijn in verschillende laboratoria onderzocht, soms met wisselend resultaat. Thrombin peptide TP508 is een synthetisch peptide dat uit 23 aminozuren bestaat en recent is ontwikkeld om bloedvatgroei te stimuleren. TP508 peptide is het fragment van humaan thrombine dat kan binden aan receptoren op de membraan van cellen; in proefdieren versnelt TP508 wondheling in zachte weefsels en stimuleert het fractuurherstel. In *hoofdstuk 5* beschreven wij het effect van TP508 op de productie van extracellulaire matrix eiwitten tijdens distractie osteogenese van pijpbeenderen in de poten van konijnen.

Semi-kwantitieve immunohistochemie toonde aan dat na injecties van hoge doses (300  $\mu$ g) TP508 in de distractie spleet er meer cellen te zien waren die positief kleurden voor RUNX2 en OPN dan na injecties met fysiologisch zout of met lage doses (30  $\mu$ g) TP508. Dit suggereerde dat TP508 het aantal en/of de activiteit van osteogene cellen in de distractiespleet verhoogde door direct de RUNX2 productie in die cellen te induceren of te verhogen. Om dit na te gaan onderzochten wij met behulp van kwantitatieve polymerase ketting reactie (PCR) of TP508 de hoeveelheid mRNA van Runx2 rechtstreeks kon verhogen in de muizen osteoblast-cel lijn MC3T3-E1. Tegen de verwachting in kon TP508 de hoeveelheid Runx2 mRNA in deze cellen niet significant verhogen. Dit resultaat wees er op dat de toename van RUNX2-positieve cellen in de distractiespleet mogelijk niet het gevolg was van een directe activering van osteogene cellen door TP508, maar waarschijnlijk indirect door stimulatie van bloedvatvorming.

Samenvattend, de moleculaire, cellulaire en structurele aspecten van botvorming in de atrofische humane kaak onderworpen aan distractie vertonen veel overeenkomsten met processen beschreven bij proefdieren.

Onze studies lijken er op te wijzen dat de distractiesnelheid bij klinische behandelingen lager moet zijn dan gevonden in dierstudies. Vascularisatie lijkt van groot belang voor botherstel in de spleet. Het stimuleren van vascularisatie in de spleet is daarom een aantrekkelijke manier om botgroei te versnellen.

